

电磁脉冲照射后小鼠睾丸生精细胞凋亡与 Smad4 表达变化的关系

纪欣欣 侯武刚 赵洁 赵勇 李伟 张远强

(第四军医大学基础部组织学与胚胎学教研室 西安 710032)

摘要 探讨 Smad4 与电磁脉冲照射后小鼠睾丸生精细胞凋亡的关系。采用场强为 400kV/m 的电磁脉冲照射对成年 Balb/c 小鼠进行全身照射,于照射后 1d、7d、14d、21d、28d 分别取小鼠睾丸组织制备石蜡切片;运用常规苏木精-伊红染色 (Hematoxylin-Eosin staining, HE staining) 和原位末端标记术 (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling method, TUNEL) 观察各照射组及对照组小鼠睾丸生精细胞的凋亡情况;免疫组织化学 ABC 法观测照射后 Smad4 在照射组睾丸内表达强度及分布的变化。HE 染色显示照射后 1d 即可见大量凋亡与坏死生精细胞向管腔排放,至照射后 28d 生精小管结构基本恢复正常;免疫组织化学结果显示 Smad4 于照射后在生精小管中出现强阳性表达,照射后 7d、14d、21d 在间质细胞胞质表达强度较对照组显著降低 ($p<0.05$);TUNEL 结果显示照射后各时间组生精细胞凋亡数量较对照组明显增加 ($p<0.01$)。结果提示 Smad4 及其介导的 TGF- β /Smad 信号通路可能在电磁脉冲照射后睾丸生精细胞凋亡过程中发挥重要作用。

关键词 电磁脉冲照射, 凋亡, Smad4, 转化生长因子 β , 生精细胞

中图分类号 R818, Q492.4, R594

在正常精子发生及成熟过程中,广泛存在生精细胞凋亡的现象,机体通过凋亡来维持生精小管环境中精子数量的平衡,这对于维持成熟精子的数量,保证精子的正常发育和成熟,确保睾丸发挥正常的生理机能是必需的^[1]。但在某些病理条件下,如辐射、垂体切除术、睾丸扭转、实验性隐睾等都会造成生精细胞的过量凋亡,导致生精障碍。研究表明,转化生长因子 β (Transforming growth factor beta, TGF- β) 是与凋亡密切相关的细胞内源性因子,一定剂量的外源性 TGF- β 1 和 TGF- β 2 会诱导体外培养的胚胎期前精原细胞的凋亡,它在生精细胞的增殖期可直接引起精原细胞的凋亡^[2]。本实验观察了 TGF- β 下游分子 Smad4 在电磁脉冲照射后小鼠睾丸中表达及分布的变化,与照射后生精细胞的凋亡情况相结合,探讨电磁脉冲照射后 TGF β /Smad 通路与生精细胞凋亡的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组和辐射

10 周龄雄性 Balb/c 小鼠 40 只,体重 (28 ± 1) g,

购自第四军医大学实验动物中心。随机分为 400kV/m 照射组与对照组各 20 只。将照射组小鼠装入有机玻璃盒内,垂直置于辐射场中,接受场强为 400kV/m 的全身照射,脉冲前沿 3ns,半宽 340ns,脉冲间隔 25s,共计 200 个电磁脉冲,对照组小鼠置于相同的环境中假照射。

1.2 组织标本制备及 HE 染色

各组小鼠分别于照射后 1d、7d、14d、21d、28d 取 4 只,在戊巴比妥钠腹腔注射 (40 mg/kg) 麻醉下,取双侧睾丸固定于 Bouin's 液 24h,常规脱水石蜡包埋,连续切片 (4 μ m),裱贴于粘片剂三-氨丙基三乙氧硅烷 (3-Minopropyltriethoxy silane, APES) 处理过的载玻片上,制备石蜡切片备用。常规 HE 染色,Zeiss 光学显微镜观察并照相。

1.3 免疫组织化学 SABC 法

石蜡切片脱蜡至水,0.3%甲醇- H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶 30min;1:100 稀释的山羊抗 Smad4 抗体 4℃冰箱孵育过夜;生物素标记兔抗山羊 IgG 抗体 (1:400 稀释) 室温孵育 2h;ABC 复合物 (1:

国家自然科学基金 (30370750)、全军医药卫生科研基金 (01MA183) 资助

第一作者:纪欣欣,女,1982 年 1 月出生,2004 年毕业于第四军医大学,组织胚胎学专业,硕士研究生

通讯联系人:张远强

收稿日期:初稿 2006-10-23,修回 2007-01-21

300 稀释)室温孵育 1h。以上各步间均用 0.01mol/L, pH 7.2 的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)振洗 10min/3 次。二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色以镜下观察为准,脱水、透明,中性树胶封片。空白对照和替代对照分别用 0.01mol/L, PBS 和正常山羊血清取代一抗。Zeiss 光学显微镜观察、测量并照相。

1.4 细胞凋亡原位检测

石蜡切片常规脱腊入水, 0.3%甲醇- H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶 10min; TBS1:200 稀释蛋白酶 K, 37℃消化 15min; 标记缓冲液 20 μ L/片, 甩干, 加含 TdT、dig-dUTP 的标记缓冲液 20 μ L/片, 37℃孵育 2h; 封闭液室温封闭 30min, 甩干后加生物素化抗地高辛抗体 1:100, 37℃孵育 30min; TBS1:100 稀释的链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(Streptavidin-biotin-peroxidase Complex, SABC) 37℃孵育 30min, 以上各部之间用三乙醇胺缓冲盐水溶液(Triethanolamine-buffered saline solution, TBS)洗; DAB 显色后, 苏木精复染, 脱水、透明、封片。以 TBS 替代含 TdT 的标记缓冲液为阴性对照, 以博士德公司提供的阳性对照片(小肠组织)为阳性对照。Zeiss 光学显微镜观察、计数并照相。

1.5 统计学分析

免疫组织化学结果用 Image-Pro Plus (Zeiss) 软件进行灰度分析, 200 倍下每张组织切片, 随机取 4 个面积, 每个面积为 0.015mm², 随机测定 5 个阳性细胞的灰度值, 采用 Excel 统计软件以 $\bar{x} \pm s$ 作折线图; 用 SPSS11.5 统计软件进行方差分析, 所有数据符合正态分布和方差齐性的条件, 以 $p < 0.05$ 为具有显著性差异。

原位末端标记术(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling method, TUNEL, TUNEL)法在显微镜下随机选取并记录 50 个生精小管横切面的阳性细胞数和阴性细胞数。把含一个以上凋亡细胞的生精小管定义为阳性生精小管, 计算阳性生精小管百分率和生精细胞凋亡指数(Apoptotic index, AI), $AI = (\text{阳性细胞数} / \text{总细胞数}) \times 1000$ 。阳性生精小管率和 AI 值采用 Mann-Whitney U 检验进行数据分析, 以 $p < 0.01$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 HE 染色

对照组生精小管内生精上皮排列规则整齐(见

图 1)。照射后 1d 可见生精小管管腔内以圆形精子细胞为主的大量生精细胞脱落, 胞质嗜酸性增强(见图 2); 照射后 7d 可观察到部分生精细胞内出现空泡, 染色质边集成月芽状, 细胞中央呈现空白; 照射后 14d 生精小管内呈现恢复趋势, 仍可见脱落入管腔的凋亡与坏死精母细胞; 照射后 21d 和 28d, 生精小管结构已基本恢复正常。

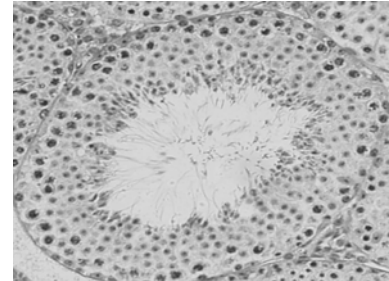


Fig.1 HE stain of control mice testis (×400)

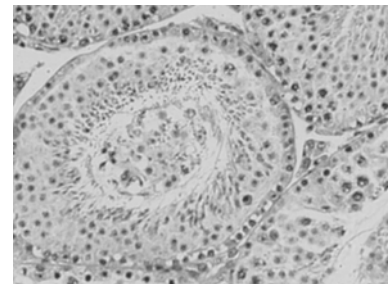


Fig.2 HE stain of mice testis at 7 days after irradiation (×200)

2.2 免疫组织化学 SABC 法

在正常成年小鼠睾丸中, Smad4 蛋白主要表达于间质细胞的胞质中, 而各级生精细胞未见阳性表达(见图 3)。电磁脉冲(Electromagnetic pulses, EMP)照射后 Smad4 在间质细胞中的表达明显减弱, 照射后 1d 和 7d, Smad4 在近管腔的精子细胞中呈强阳性表达, 并且在少量初级精母细胞中有弱阳性表达(见图 4); 照射后 14d—28d, 可见 Smad4 在生精小管的粗线期精母细胞胞质以及近管腔的精子细胞呈强阳性表达。图象分析显示, Smad4 在照射后 7d、14d 和 21d 组在间质细胞胞质表达强度较对照组显著降低($p < 0.05$), 见图 5。

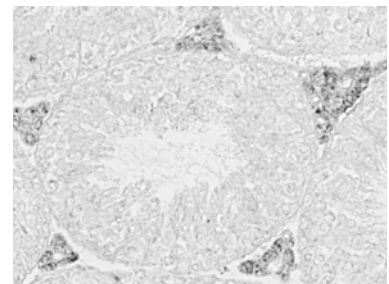


Fig.3 Expression of Smad1 in normal adult mice testes (Immunohistochemical method ×400)

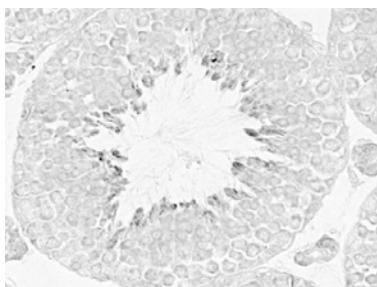


Fig.4 Expression of Smad1 at 21 days after irradiation (Immunohistochemical method×200)

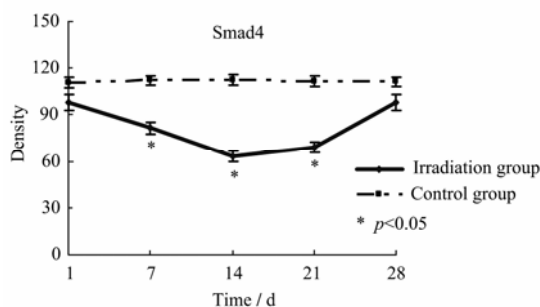


Fig.5 The expression of Smad4 in Leydig cells decreased significantly in 7d, 14d, 28d irradiation groups compared with that of control groups

2.3 TUNEL 检测

在正常对照组小鼠睾丸内, TUNEL 标记阳性细胞主要为精母细胞和少量精原细胞, 为圆形致密棕褐色沉淀 (见图 6), 其他细胞未见明显阳性表达。照射后 1d 生精小管凋亡细胞数较对照组即明显增多 (见图 7), 并于 14d 达到峰值, 随后开始下降。照射后各时间组阳性生精小管百分率及 AI 值与正常对照组相比均有显著性差异 ($p<0.01$) (见图 8, 9)。

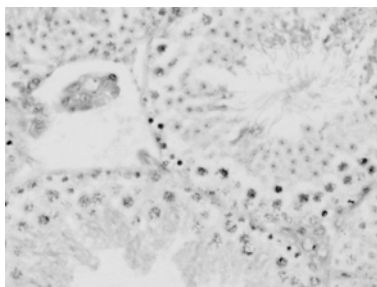


Fig.6 TUNEL assay of control mice testis (×400)

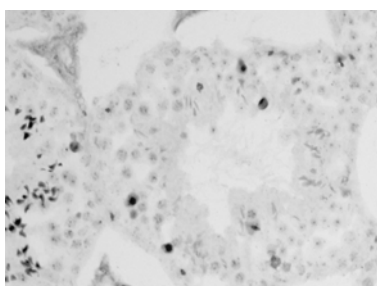


Fig.7 TUNEL assay of mice testis at 7 days after irradiation (×400)

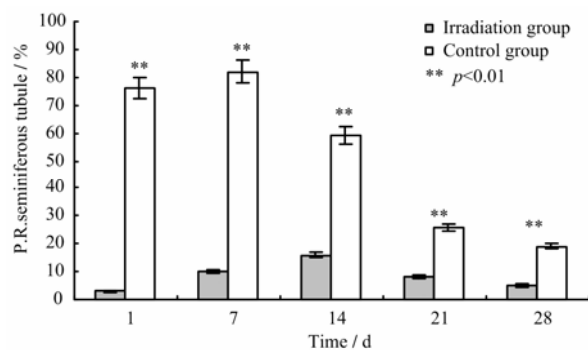


Fig.8 The positive seminiferous tubule rates were significantly higher in irradiation groups compared with that of control groups

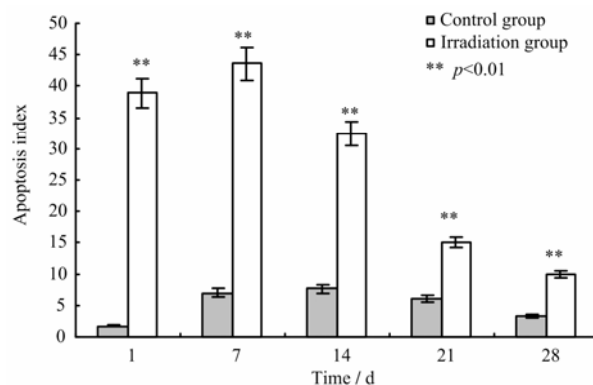


Fig.9 The apoptosis indexes in spermatogenic cells were significantly higher in irradiation groups compared with that of control groups

3 讨论

电磁脉冲照射 (Electromagnetic pulses, EMP) 属于高能非电离辐射, 能量集中、超宽频带, 几乎覆盖电磁波谱的所有频段^[3]。研究表明, 一定强度的电磁脉冲照射会导致小鼠睾丸生精细胞的凋亡与坏死^[4]。

一方面, EMP 对细胞的作用以非热效应为主, 并集中作用在细胞膜上。组织细胞在瞬间 EMP 的作用下, 膜内大分子产生不可逆的构形改变, 膜受到不可逆性电击穿, 进而影响细胞的各种生物学特性及诱导细胞凋亡^[5-7]。本实验通过 HE 染色和凋亡细胞原位检测法可明显观察到照射后生精细胞的凋亡情况, 凋亡的细胞以精母细胞为主。细胞凋亡原位检测表明, 照射后 1d 可看到大量细线前期精母细胞与晚期粗线期精母细胞凋亡, 生精细胞凋亡数目于照射后 7d 较对照组显著增高, 并于 14d 达到高峰, 此后开始修复。

另一方面, 照射引起的血清激素变化也会导致生精细胞的凋亡。有研究表明, 睾丸间质细胞是对电磁脉冲敏感的细胞之一^[8], 间质细胞的主要功能

是合成和分泌睾酮,与精子产生和成熟密切相关,其受到辐射损伤后,可发生细胞水肿和空泡变性,血清睾酮在3d内即有明显下降。血清睾酮的减少可通过下丘脑-垂体-睾丸轴的代偿性作用使血清黄体刺激素(Luteotropic hormone, LH)升高,而 Kawamura 等^[9]发现, LH 可诱导生精细胞的凋亡。睾酮和 LH 的异常变化导致生精细胞发生凋亡。

肿瘤抑制基因 Smad4 与细胞凋亡密切相关,它是转化生长因子超家族成员 TGF- β , activin, 骨形态蛋白(BMPs)介导的信号通路的共同中介分子,将信号从胞浆转入核内,进而通过调节不同转录因子活性而发挥生理功能。Narula 等^[10]发现, Smad4 在转基因小鼠中过表达会导致生殖细胞凋亡,精子发生停止以及生精小管退化的现象;在睾丸精原细胞瘤中,体细胞 Smad4 基因突变失活导致的相关蛋白功能缺失是肿瘤发生的重要原因^[11],同时也导致 TGF- β 超家族其他成员如骨形成蛋白(BMPs), activin 活性异常。本实验发现 Smad4 于照射后在生精上皮的精母细胞以及圆形精子细胞中出现强阳性表达,说明 Smad4 在生精细胞中表达增加可能是照射后细胞凋亡的原因之一。Smad4 在正常小鼠睾丸中仅表达于间质细胞中,而照射后 Smad4 蛋白表达量在间质细胞内明显减少,推测 Smad4 可能通过调节间质细胞的分泌功能,引起血清睾酮和黄体刺激素 LH 的变化,从而直接或间接影响精子的发生或者生精细胞的凋亡。

此外,大量研究证明 Smad4 可介导不同组织细胞发生凋亡。例如, Smad4 作为主要调控因子可介导 TGF- β 1/Smad 转导途径诱导人肝癌细胞系发生凋亡^[12]; Brodin 等^[13]发现, Smad4 在去势大鼠前列腺上皮细胞表达增强,且主要出现在含大量凋亡细胞的区域,提示 Smad4 与前列腺上皮细胞凋亡关系密切。但 Ye 等^[14]通过 RNAi 技术对人胚胎性横纹肌肉瘤细胞中 Smad4 mRNA 和蛋白表达的有效封闭,抑制了人胚胎性横纹肌肉瘤细胞的生长并且诱导其凋亡,说明 Smad4 虽然是一种肿瘤抑制基因,但同时具有促进生长的作用。

综上所述, Smad4 及其介导的 TGF- β /Smad 信号通路在电磁脉冲辐射后生精细胞凋亡中具有重要作

用,其具体的作用机制还需进一步研究。

参考文献

- 1 Gong S L, Liu S Z. Foreign Med Sci. Sect Radiol and Nuclear Med Sci, 1999, **23**(5): 227-230
- 2 Olaso R, Pairault C, Boulogne B, et al. Endocrinology, 1998, **139**(2): 733-740
- 3 Gailey P C, Easterly C E. Health Phys, 1993, **65**(4): 437-439
- 4 侯武刚, 赵洁, 张远强, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, **23**(6): 366-370
HOU Wugang, ZHAO Jie, ZHANG Yuanqiang, et al. J Radiat Res Radiat Process, 2005, **23**(6): 366-370
- 5 刘长军, 王保义, 张弘, 等. 生物医学工程学杂志, 1998, **15**(3): 294-297
LIU Changjun, WANG Baoyi, ZHANG Hong, et al. Journal of Biomedical Engineering, 1998, **15**(3): 294-297
- 6 Seaman R L, Belt M L, Doyle M L, et al. Phy Behav, 1998, **65**(2): 263-270
- 7 Fedorowski A, Steciwko A. Med Pr, 1998, **49**(1): 93-105
- 8 王水明, 王德文, 彭瑞云, 等. 中华男科学, 2003, **9**(5): 327-330
WANG Shuiming, WANG Dewen, PENG Ruiyun, et al. National J Andrology, 2003, **9**(5): 327-330
- 9 Kawamura K, Kumagus J, Sudo S, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101**(19): 7323-7328
- 10 Narula A, Kilen S, Ma E, et al. American Journal of Pathology, 2002, **161**(5): 1723-1734
- 11 Devouassoux-Shisheboran M, Mauduit C, Tabone E, et al. APMIS, 2003, **111**(1): 212-224
- 12 王春雷, 万远廉, 刘玉村, 等. 北京大学学报(医学版), 2006, **38**(2): 176-178
WANG Chunlei, WAN Yuanlian, PENG Ruiyun, et al. Journal of Peking University (Health Science), 2006, **38**(2): 176-178
- 13 Brodin G, Ten D P, Funa K, et al. Cancer Res, 1999, **59**(11): 2731-2738
- 14 Ye L, Zhang H, Zhang L, et al. Int J Oncol, 2006, **29**(5): 1149-1157

The expression of Smad4 after radiation of electromagnetic pulses and apoptosis in spermatogenic cells in mouse

JI Xinxin HOU Wugang ZHAO Jie ZHAO Yong LI Wei ZHANG Yuanqiang

(Department of Histology and Embryology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

ABSTRACT The aim of the study was to investigate the relationships between apoptosis induced by radiation of electromagnetic pulses (EMP) and the expression of Smad4 in mouse spermatogenic cells. 40 adult Balb/c mice were used, and 20 were irradiated with whole-body 400kV/m EMP. The mice were sacrificed and specimens were harvested at 1, 7, 14, 21 and 28 days after the irradiation. Histological changes were observed through Hematoxylin-Eosin staining (H-E staining), the apoptosis of spermatogenic cells was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling method (TUNEL method) and the Smad4 expression was observed using immunohistochemistry SABC methods. Severe injuries were observed 1 day after the radiation and seminiferous epithelium was mostly recovered 28 d after the radiation. The localization of smad4 was significantly different in EMP group compared to the control group, and the expression densities of smad4 decreased significantly at 7, 14 and 21 d after irradiation ($p < 0.05$). TUNEL assays demonstrated that there was a significant increase in the mean apoptotic index (AI) in irradiation groups than that of control groups ($p < 0.01$). The results suggested that Smad4 and TGF- β /Smad signal pathway might play an important role in spermatogenic cells apoptosis induced by radiation of EMP.

KEYWORDS Electromagnetic pulses (EMP), Apoptosis, Smad4, Transforming growth factor- β (TGF- β), Spermatogenic cells

CLC R818, Q492.4, R594